

SHR の肥大心におけるフリーラジカル 障害に対する防禦系の異常

鳥井 幹 則 伊 藤 浩 行 鈴 木 庸 之

近畿大学医学部第1病理学教室

Defense systems for lipid peroxidation by free radicals
in SHR hypertrophied myocardium

Mikinori Torii, Hiroyuki Ito and Tsuneyuki Suzuki

First Department of Pathology, Kinki University School of Medicine,
Osaka, Japan

ABSTRACT

Antiperoxidation ability in myocardium were examined in SHR and WKY at 6 and 16 weeks of age. At 6 weeks of age, glutathion peroxidase activity was higher in SHR than in WKY, but at 16 weeks of age, it was lower. Superoxide dismutase activity, particularly CuZn-SOD in cytosol fraction, was lower in SHR at 16 weeks of age than in age-matched WKY. Furthermore, the α -tocopherol content was significantly lower in SHR than in WKY at both 6 and 16 weeks of age. These findings indicate that antiperoxidation ability is less active in the SHR myocardium. This may be one of the causative factors for myocardial vulnerability in SHR.

Key words : myocardium, glutathion peroxidase, superoxide dismutase, tocopherol

結 言

我々はこれまで SHR の肥大心における心筋脆弱性を形態学的, 生化学的に検索し, その原因として細胞膜の脂質過酸化とそれに基づく膜関連酵素の異常を明らかにしてきた^{1,2}. 近年, 虚血性心筋障害においてフリーラジカルによる脂質過酸化が重要な役割を演じていることが明らかにされており^{3,4}, SHR における心筋障害にも当然フリーラジカルの関与が考えられる. そこで SHR 心筋における細胞障害とフリーラジカルとの関連性を明らかにするために, ラジ

カル障害に対する防禦系の検索を企図し, 心筋内のラジカルスカベンジャーについて, 正常血圧の WKY と比較検討した.

材料および方法

1. 動物

生後 6 週および 16 週の雄の SHR と同年令の WKY を用いた. 動物はいずれも空調の完備した動物室で飼育し, 飼育用飼料 (船橋 SP) および水道水を自由に摂取させた. 血圧は無麻酔下で tail-pulse pickup 法により測定した. 各週令においてそれぞれ 6—8 匹のラットをエー

テル麻酔下に脱血屠殺し、直ちに心臓を採取した。両心房および右心室を切除した後、左心室および中隔を中央部で水平に2等分した。

2. Glutathion peroxidase (GSH-Px) および Superoxide dismutase (SOD) 活性の測定

2分した左心室・中隔の上半分を 0.25 M sucrose-10 mM Tris buffer (pH 7.4) でホモジネートし、常法に従って 1,000×g 10分, 10,000×g 10分, 105,000×g 35分の遠心分離を行って、ミトコンドリア (MIT) および可溶性分画 (SOL) を得た。10,000×g の上清を用いて Whanger 等⁵ の方法により GSH-Px 活性を測定した。また16週令のラットより得た MIT および SOL 分画を用いて、大柳⁶ の重

硝酸法により SOD 活性を測定した。いずれも蛋白量で補正し、比活性で表した。

3. トコフェロールの定量

左心室・中隔の下半分を用いて、阿部ら⁷ の方法によりトコフェロールを抽出した。すなわち、心筋を純水でホモジネートし、n-hexan を加えてトコフェロールを抽出した後、HPLC (Waters Model 440) を用いて蛍光法により測定した。

結 果

1. 血圧および心重量

表1は用いたラットの血圧と心重量(体重比)を示している。SHR は6週令ですでに血圧は

Table 1 Blood pressure and heart weight of SHR and WKY

Age (weeks)		Blood pressure (mmHg)	Heart weight (mg/g body weight)
6	WKY	120±1	4.13±0.03
	SHR	134±2*	4.32±0.04*
16	WKY	137±5	3.53±0.02
	SHR	215±10*	4.15±0.06*

Mean±SE, * Significantly different from WKY (p<0.01)

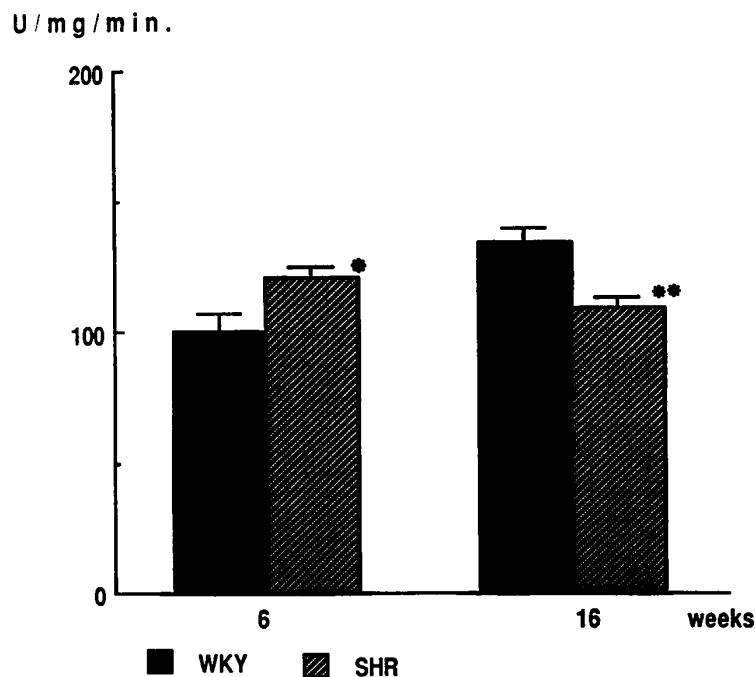


Fig. 1 Glutathion peroxidase activity in myocardium.

■ WKY ▨ SHR

Mean±SE, Significantly different from WKY

* p<0.05 ** p<0.01

WKY より高値を示したが、未だ正常範囲であった。しかし、心重量は有意に高値を示した。16週令では SHR は明かな高血圧を示し、また明瞭な心肥大が認められた。

2. GSH-Px および SOD 活性

図1にみられるように、心筋における GSH-Px 活性は6週令では SHR が有意に高値を示した。WKY では成熟にともない活性の上昇がみられたが、SHR ではむしろ低下し、16週令

では WKY に比べ有意に低値を示した。

表2は心筋における SOD 活性を示している。MIT ではその90%が Mn-SOD であり、SOL では95%が CuZn-SOD であった。MIT 分画における総 SOD 活性は SHR が低値を示す傾向がみられたが、Mn-SOD には差がみられなかった。また、SOL では総 SOD 活性も CuZn-SOD 活性もいずれも SHR が有意に低値を示した。

Table 2 SOD activities in myocardium of SHR and WKY

Fraction	SOD	SHR	WKY
MIT	Total-SOD	1375.1±42.5	1469.3±20.3
	Mn-SOD	1252.1±61.8	1181.1±33.1
	CuZn-SOD	123.0±27.2*	328.2±49.4
SOL	Total-SOD	389.6±12.3*	440.8±12.0
	Mn-SOD	19.1±1.0	19.2±0.9
	CuZn-SOD	370.3±11.9*	421.6±11.5

U/mg protein, Mean±SE

* Significantly different from WKY ($p<0.05$)

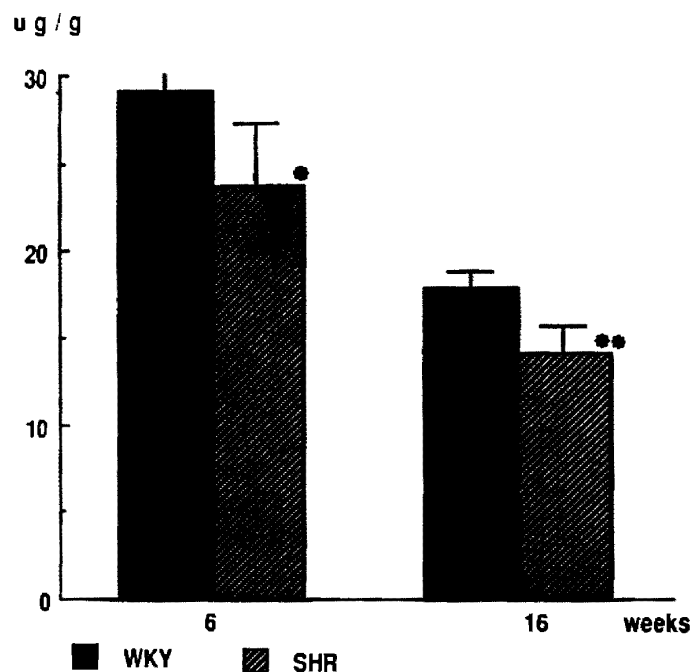


Fig. 2 α -tocopherol content in myocardium.

■ WKY ▨ SHR

Mean±SE, Significantly different from WKY

* $p<0.05$ ** $p<0.01$

3. トコフェロール量

4種のトコフェロールの同族体のうち、心筋では、SHRでもWKYでも、その大部分が α -トコフェロールであった。図2にみられるように、 α -トコフェロール含量はSHRでもWKYでも成熟にともなって減少するが、いずれの週においてもSHRはWKYに比べ有意に低値であった。

考 察

虚血性心筋障害におけるフリーラジカルの役割については、Hearse等⁸の報告以来多数の実験的研究がなされており、フリーラジカルによる細胞膜の磷脂質の過酸化が、細胞障害の原因として重要であることが認められている。また、SHRの肥大心においても、心筋障害易発症性の原因の一つに膜磷脂質の過酸化の亢進が証明されており、その背景としてラジカル防禦機構の障害が推測されている。今回の実験では、検討したGSH-Px, SOD, およびトコフェロールのすべてにおいて、16週のSHRでは低下がみられた。Janero & Burghardt⁹は12週令のSHRとWKYを用いてVEと過酸化脂質の生成を調べ、SHRではVE欠乏の状態にあり脂質過酸化が亢進していることを報告している。これらの結果はいずれも、すでに我々が報告したSHR肥大心における脂質過酸化の亢進を裏づけるものであり、心筋の脆弱性の原因として重要な因子と考えられる。しかし、この特徴がSHRの持つ遺伝的な欠陥によるものか、あるいは高血圧による2次的な変化であるかは、今後に残された課題である。

文 献

1. Torii M, Ito H., Suzuki T. Morphological and biochemical studies on hypertrophied SHR myocardium mitochondria and plasma membrane. *Jpn Heart J* 1989; 30: 586.
2. Torii M., Ito H. Some enzyme characteristics of spontaneously hypertensive rat myocardium. *Jpn Circ J* 1990; 54: 688-694.
3. McCord JM. Oxygen-driven free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
4. Simpson PJ., Lucchesi BR. Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1987; 110: 13-30.
5. Whanger PD., Weswig PH., Schmitz JA., Oldenfield JE. Effects of selenium and vitamin E on blood selenium levels, tissue glutathione peroxidase activities and white muscle disease in sheep fed purified hay diets. *J Nutr* 1977; 107: 1298-1307.
6. Ōyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 1984; 142: 290-296.
7. Abe K., Yuguchi Y., Katsui G. Quantitative determination of tocopherols by high-speed liquid chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol* 1975; 21: 183-188.
8. Hearse DJ., Humphrey SM., Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 1973; 5: 395-407.
9. Janero DR., Burghardt B. Cardiac membrane vitamin E and malondialdehyde levels in heart muscle of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Lipid* 1989; 24: 33-38.